



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 203 15 159 U1 2004.02.26

(12)

Gebrauchsmusterschrift

(22) Anmeldetag: 01.10.2003

(47) Eintragungstag: 22.01.2004

(43) Bekanntmachung im Patentblatt: 26.02.2004

(51) Int Cl.⁷: C07H 21/00

(30) Unionspriorität:

60/467,117 30.04.2003 US

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:

Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

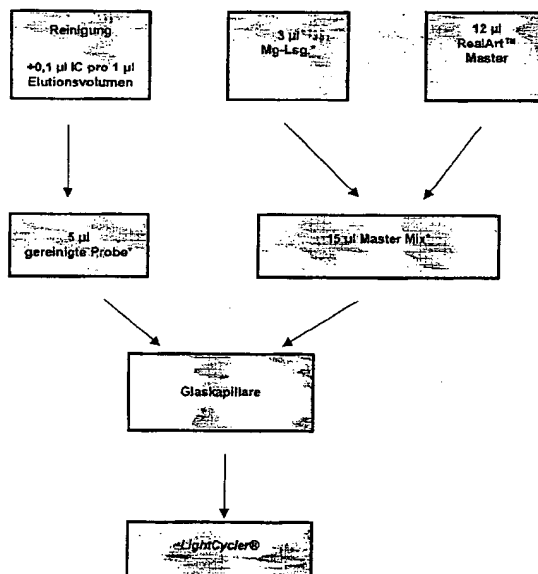
(71) Name und Wohnsitz des Inhabers:

Artus Gesellschaft für molekularbiologische
Diagnostik und Entwicklung mbH, 22767
Hamburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Kit zum Nachweis eines neuen Coronavirus, das mit dem Schweren Akuten Atemwegssyndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) assoziiert ist

(57) Hauptanspruch: Kit zum Nachweis des Schweren Akuten Atemwegssyndromassoziierten Virus (SARS-assoziiertes Virus), genannt HPAC (Humanes Pneumonie-assoziiertes Coronavirus), mittels Real-Time RT-PCR, das einen Forward-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist, einen Reverse-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden umfasst, die an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 89 bis 132 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist.



Beschreibung

[0001] Das SARS-assoziierte Virus, das vorläufig als HPAC (Humanes Pneumonieassoziiertes Coronavirus) bezeichnet wird, wurde kürzlich von Drosten et al. identifiziert, und es wurde eine qualitative Real-Time RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) offenbart [Drosten et al. (2003) "Identification of a novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome", veröffentlicht in New England Journal of Medicine bei www.nejm.org, 10. April 2003].

[0002] Basierend auf diesen Sequenzdaten wurde ein effizientes, sensitives und verlässliches quantitatives Real-Time RT-PCR-Verfahren entwickelt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft ein effizientes, sensitives und verlässliches quantitatives Real Time RT-PCR-Verfahren zum Nachweis des Schweren Akuten Atemwegssyndrom-assoziierten Virus (SARS-assoziiertes Virus) sowie Oligonukleotide und Kits zum Nachweis des SARS-assoziierten Virus.

Beschreibung der Figuren

[0004] **Fig. 1:** Zusatz der Internen Kontrolle zum Reinigungsverfahren. Schematischer Arbeitsgang für die Kontrolle von Reinigungs-Verfahren und PCR-Inhibierung.

–Es sollte sichergestellt werden, daß die Lösungen vollständig aufgetaut, sorgfältig gemischt und zentrifugiert werden

[0005] **Fig. 2** Zusatz der Internen Kontrolle zum RealArt™-Master. Schematischer Arbeitsgang für die Kontrolle der PCR-Inhibierung

–Es sollte sichergestellt werden, daß die Lösungen vollständig aufgetaut, sorgfältig gemischt und zentrifugiert werden

[0006] **Fig. 3** Reverse Transkription der RNA.

[0007] **Fig. 4** Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

[0008] **Fig. 5** Amplifikation der cDNA.

[0009] **Fig. 6** Abkühlen

[0010] **Fig. 7** Nachweis der Quantifizierungs-Standards (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) im Fluorimeter-Kanal F1/F2. NTC: nicht-Template-Kontrolle

[0011] **Fig. 8** Nachweis der Internen Kontrolle (IC) im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 parallel mit gleichzeitiger Amplifikation von Quantifizierungs-Standards (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) NTC: nicht-Template-Kontrolle.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0012] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis des Virus, das mit dem Schweren Akuten Atemwegssyndrom assoziiert ist (SARS-assoziiertes Virus) und als HPAC (humanes Pneumonie-assoziiertes Coronavirus) bezeichnet wird, bei dem eine Real-Time RT-PCR-Reaktion unter Verwendung einer biologischen Probe durchgeführt wird. Gemäß einer Ausführungsform weist der Forward-Primer eine Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden auf und bindet an einen Bereich, der durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist, wobei der Reverse-Primer eine Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden aufweist und an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde eine Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden aufweist und an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 89 bis 132 der in SEQ 2D NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist; und bei dem das SARS-Virus durch Nachweis der Real-Time-Fluoreszenz nachgewiesen wird, wenn eine Amplifikation von Virus-spezifischer Sequenz stattfindet.

[0013] Der Forward-Primer kann an einen Bereich von ungefähr Nukleotid 1 bis ungefähr Nukleotid 240 der SEQ ID NO:1 binden. Der Reverse-Primer kann an einen Bereich von ungefähr Nukleotid 60 bis ungefähr Nukleotid 300 der SEQ 2D NO:1 binden. Die Sonde kann somit an einen Bereich zwischen ungefähr Nukleotid 21 und ungefähr Nukleotid 279 der SEQ ID NO:1 binden. Im allgemeinen ist es nützlich, ein Amplifikationsprodukt zu erhalten, das mindestens ein 80mer ist.

[0014] Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist der Forward-Primer eine Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden auf und bindet an einen Bereich, der durch die Nukleotide von ungefähr 1 bis ungefähr 240 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz definiert ist; wobei der Reverse-Primer eine Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden aufweist und an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide von ungefähr 60 bis ungefähr

300 der in SEQ 2D NO:1 dargestellten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde eine Länge von ungefähr 12 bis 40 Nukleotiden aufweist und an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide von ungefähr 21 bis ungefähr 279 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist; und bei dem das SARS-Virus durch Nachweis der Real-Time-Fluoreszenz nachgewiesen wird, wenn eine Amplifikation von Virus-spezifischer Sequenz stattfindet.

[0015] Gemäß einer besonderen Ausführungsform weist der Forward-Primer die in SEQ ID NO:2 gezeigte Sequenz auf, der Reverse-Primer weist die in SEQ ID NO:3 gezeigte Sequenz auf und die Sonde weist die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Sequenz auf.

[0016] Besonders nützliche Bindungs-Regionen innerhalb der SEQ 2D NO:1 reichen von ungefähr Nukleotid 30 bis ungefähr Nukleotid 100 (A), von ungefähr Nukleotid 120 bis ungefähr Nukleotid 170 (B), und von ungefähr Nukleotid 230 bis ungefähr Nukleotid 270 (C). Forward- und Reverse-Primer können somit aus jeder Auswahl aus den Bereichen A, B und C ausgewählt werden, d.h. wenn Forward- und Reverse-Primer innerhalb der Bereiche A und B binden, müßte die Sonde „dazwischen“ binden, d.h. an die so amplifizierte Sequenz. Ebenfalls möglich sind die Primer-Kombinationen A+C oder B+C, die den Sequenzbereich bestimmen, an den die Sonde bindet.

[0017] Die Länge der Primer kann zwischen ungefähr 18 und ungefähr 35 Nukleotiden variieren, oder jeden spezifischen Wert innerhalb dieses besagten Bereiches annehmen. Gemäß einer besonderen Ausführungsform weisen die Primer eine Länge von zwischen ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden auf und binden innerhalb eines Bereiches von Nukleotid 69 bis Nukleotid 98 oder von Nukleotid 123 bis Nukleotid 168.

[0018] Die Länge der Sonde kann zwischen ungefähr 12 und 40 Nukleotiden variieren, oder jeden spezifischen Wert innerhalb dieses besagten Bereiches annehmen, der für den Nachweis der amplifizierten Sequenz nützlich ist.

[0019] Weiterhin ist es möglich, das Verfahren unter Verwendung des Minor Groove (kleine Furche der DNA)-Bindungsprinzips durchzuführen, bei dem die Länge der Sonde bis zu ungefähr 12 Nukleotiden kurz sein kann.

[0020] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird es möglich sein, zwei Sonden (beispielsweise eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 12 Nukleotiden und eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 6 bis 7 Nukleotiden) zu kombinieren, wenn das Verfahren nach dem LightCycler-Prinzip durchgeführt wird, bei dem Lichtsammel- und Quencher-Farbstoffe als Sonden verwendet werden. Dieses Verfahren ist dem Fachmann hinreichend bekannt. Alternativ dazu können Sonden nach dem gequenchten FRET-Prinzip verwendet werden, das in Krupp et al.: "Nucleic acid preparations of pathogens from biological samples for real-time PCR analysis", Nucleic Acids Isolation Methods (Bowien, B. & Dürre, P., Herausgeber), American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2002, offenbart wird.

[0021] Die nachfolgenden, einzelnen Primer sind spezifisch von den einzelnen Primern der Erfindung ausgeschlossen: (1) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 68 bis Nukleotid 87 bindet (entspricht BNITMS1 in Drosten et al.); (2) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 82 bis Nukleotid 101 bindet (entspricht BNlinS in Drosten et al.); (3) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 34 bis Nukleotid 57 bindet (entspricht BNloutS2 in Drosten et al.); (4) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 124 bis Nukleotid 145 bindet (entspricht BNITMAS2 in Drosten et al.); (5) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 169 bis Nukleotid 190 bindet (entspricht BNlinAs in Drosten et al.); und (6) ein Primer, der an den Bereich von Nukleotid 203 bis Nukleotid 223 bindet (entspricht BNloutAs in Drosten et al.).

[0022] Ferner sind hinsichtlich der erfindungsgemäßen Verfahren und der erfindungsgemäßen Primerpaare die spezifischen Kombinationen von (1) und (4), (2) und (5) sowie (3) und (6) der oben beschriebenen, spezifisch ausgeschlossenen Primer ebenfalls von den erfindungsgemäßen Primerpaaren und von den erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung solcher Primerpaare ausgeschlossen. Es sollte jedoch verstanden werden, daß die einzelnen Primer (1) bis (6) als Teil eines Primerpaares mit anderen Primern, die nicht den Primern (1) bis (6) entsprechen, in den erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden können, falls dies gewünscht wird.

[0023] Gemäß einer besonderen Ausführungsform ist der Reporter-Farbstoff FAM, 6-FAM, 5-FAM und ALEXA-288. Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der Quencher-Farbstoff TAMRA, DABCYL oder QSY.

[0024] Das Nachweisverfahren ist entweder ein qualitatives oder ein quantitatives Verfahren. Der Nachweis ist insbesondere ein quantitativer Nachweis der Real-Time-Fluoreszenzsignal-Intensität.

[0025] Die biologische Probe, die zum Nachweis des SARS-assoziierten Virus verwendet wird, ist eine Körperflüssigkeit und insbesondere Sputum, Stuhl oder Blut.

[0026] Der Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß zum ersten Mal der quantitative Nachweis von SARS-assoziiertem Virus mit einer theoretischen Nachweissgrenze von 10 Genom-Äquivalenten in der PCR möglich ist, was 120 RNA-Kopien pro ml der biologischen Probe entspricht. Das RT-PCR-Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ist in mindestens 95% der untersuchten Fälle positiv.

[0027] Die PCR-Effizienz entspricht im wesentlichen dem theoretischen Wert von 2. Die Effizienz beträgt insbesondere mindestens ungefähr 1,9.

[0028] Es ist erwähnenswert, daß das von Drosten et al. offenbarte Verfahren eine signifikant geringere Effizienz mit einer Nachweissgrenze von über 100 Genom-Äquivalenten bei der PCR aufweist.

[0029] Die vorliegende Erfindung stellt daher zum ersten Mal ein effizientes, sensitives und verlässliches quantitatives Real-Time RT-PCR-Verfahren zum Nachweis des Virus bereit, das mit dem Schweren Akuten Atemwegssyndrom assoziiert ist (SARS-assoziertes Virus).

[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Kit zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens zum Nachweis des Virus, das mit dem Schweren Akuten Atemwegssyndrom assoziiert ist (SARS-assoziertes Virus).

[0031] Das Kit ist insbesondere ein Kit zum Nachweis des SARS-assozierten Virus durch Real-Time RT-PCR und umfaßt einen Forward-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, wobei der Forward Primer an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist; einen Reverse-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, wobei der Reverse Primer an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist; und eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden, wobei die Sonde an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 89 bis 132 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist.

[0032] Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Kit einen Forward-Primer mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz, einen Reverse-Primer mit der in SEQ ID NO:3 gezeigten Sequenz und eine Sonde mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Sequenz.

[0033] Gemäß einer besonderen Ausführungsform ist der Reporter-Farbstoff FAM, 6-FAM, 5-FAM bzw. ALEXA-288. Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der Quencher-Farbstoff TAMRA, DABCYL oder QSY.

[0034] Dem Fachmann ist hinreichend bekannt, daß ein erfindungsgemäßes Kit ferner Enzyme und Reagenzien umfassen kann, die zur Durchführung einer Real-Time RT-PCR-Reaktion benötigt werden.

[0035] Die Erfindung betrifft ferner ein Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist. Das Oligonukleotid weist insbesondere die in SEQ ID NO:2 gezeigte Sequenz auf. Die Erfindung betrifft ferner ein Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 1 bis 240 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist.

[0036] Die Erfindung betrifft ferner ein Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist. Das Oligonukleotid weist insbesondere die in SEQ ID NO:3 gezeigte Sequenz auf. Die Erfindung betrifft ferner ein Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Oligonukleotide 60 bis 300 der in SEQ ID NO:1 gezeigten Sequenz definiert ist.

[0037] Die Erfindung stellt zusätzlich Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins eines SARS-assozierten Virus oder HPAC bereit, wobei die hier offenbarten Verfahren verwendet werden. Die Erfindung stellt ferner derartige Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von HPAC bereit und umfaßt ferner den Schritt des Berichtens der besagten Bestimmungsergebnisse.

[0038] Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung beschreiben, jedoch nicht einschränken.

BEISPIELE

Beispiel 1

Isolierung der viralen RNA

[0039] Die Extraktion von Nukleinsäuren wird mit dem QIAamp Viral RNA Mini-Kit (QIAGEN, 52904) oder mit dem QIAamp Ultrasens Virus Kit (QIAGEN, 53704) durchgeführt. Das Ultrasens-Kit weist den Vorteil auf, daß es die Verwendung eines 1000 µl-Probenvolumens (statt eines 200 µl-Volumens bei dem Mini Kit) ermöglicht. In beiden Fällen wird die Nukleinsäure in einem Volumen von 60 µl eluiert. Bei Verwendung von 5 µl Eluat in einer 20 µl PCR-Reaktion kann ein größeres Aliquot der Probe (1/12 von 1000 µl entspricht 83 µl Probe, anstelle von 1/12 von 200 µl, was einer 17 µl-Probe entspricht) auf das Vorhandensein von viraler RNA analysiert werden.

LightCycler™ PCR

[0040] Die Amplifikation und der Nachweis von HPAC wird durch Real-Time RT-PCR in einem LightCycler-Gerät durchgeführt. Die Spezifität des PCR-Nachweises basiert auf der Verwendung von HPAC-spezifischen

schen Primern und einer fluoreszenten, doppelt-markierten Oligonukleotid-Sonde. Die Sondensequenz ist innerhalb des Primer-definierten HPAC-Amplikons lokalisiert.

[0041] Dieser Aufbau ermöglicht die Verwendung von Fluoreszenz-Messungen zum direkten, quantitativen und spezifischen Nachweis von HPACspezifischer DNA-Amplifikation innerhalb des geschlossenen PCR-Reaktionsgefäßes. Die bei diesem Schritt verwendete Technologie basiert auf dem 5'-Exonuklease-Assay, der in den U.S.-Patenten 5,210,015 und 5,487,972 beschrieben wird. Grundlagen und Anwendungen dieser Technologie sind problemlos aus wissenschaftlichen Veröffentlichungen entnehmbar, beispielsweise aus Krupp et al., "Nucleic acid preparations of pathogens from biological samples for real-time PCR analysis", Nucleic Acids Isolation Methods (Bowien, B. & Dürre, P., Herausgeber), American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, 2002.

Auswahl der Sequenzen der Primer und der Hybridisierungssonde

[0042] Es müssen zwei Kriterien erfüllt sein. Vollständigkeit: Alle bekannten Varianten von HPAC müssen nachgewiesen werden. Spezifität: Alle anderen, nahe verwandten Coronaviridae müssen ausgeschlossen werden.

[0043] Basierend auf einem veröffentlichten, detaillierten Sequenz-Alignment (Drosten et al. (2003) "Identification of a novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome", veröffentlicht in New England Journal of Medicine bei www.nejm.org, 10. April 2003] wurden die folgenden Primer gewählt:

Sense 5' CCG	CGA AGA AGC TAT TCG TC 3' (SEQ IDNO:2); (20 nt; Position 75-94)
Antisense 5' GTA	GGT TAG TAC CCA CAG CAT CTC TAG T 3' (SEQ IDNO:3); (28 nt; komplementär zu Position 139-166).

[0044] Als Sondensequenz wurde die bei Drosten et al. veröffentlichte Sequenz ausgewählt: Sonde BNITMP 5' (6-FAM) TCG TGC GTG GAT TGG CTT TGA TGT (dabcyl) 3' (SEQ 2D NO:4); (24 nt; Position 99-122)

[0045] Die Sonde wurde am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (hier 6-FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (vorzugsweise ein nichtfluoreszierendes Quencher-ähnliches dabcyl) markiert. Wie im Stand der Technik üblich, wird das Sonden-Oligonukleotid am 3'-Ende blockiert, um die enzymatische Elongation zu verhindern. Diese Elongation würde zu einer längeren Hybridisierungssequenz führen, die eine weniger spezifische Hybridisierung mit verwandten, unerwünschten Sequenzen verursachen könnte.

Experimentelles Protokoll zur Durchführung eines HPAC-Nachweises mit Hilfe des LightCycler-Geräts

[0046] Die folgenden Reaktionsbedingungen (oder ähnliche) können verwendet werden:

Bestandteil	Volumen (µl)
2x RT/Taq-Reaktionspuffer	10
MgSO ₄ (100 mM)	1-3
BSA	1-2
Sense-Primer (100 µM)	0.1-0.5
Antisense-Primer (100 µM)	0.2-1
Sonde (30 µM)	0.1-0.5
IC-Sense-Primer (100 µM)	0.1-0.5
IC-Antisense-Primer (100 µM)	0.1-0.5
IC-JOE-Sonde (30 µM)	0.1-0.5
IC-LCR-705-Sonde (30 µM)	0.1-0.5
IC-Template (RNA)	0.1-0.5
Platinum-Taq	0.1-0.3
RT/Taq-Mix	1
HPAC-RNA oder extrahierte Nukleinsäure aus einer unbekannten Probe	5
H ₂ O	ad 20 µl

[0047] Das nachfolgende Programm wurde im LightCycler verwendet:

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Steigung [°C/sec]	2.Zieltem- peratur [°C]	Schritt Größe	Schritt Verzö- gerung	Erfassung
Reverse Transkription							
1	50	600	20	0	0	0	keine
Denaturierung							
1	95	10	20	0	0	0	keine
Amplifikation (50 Zyklen)							
1	95	2	20	0	0	0	keine
2	55	12	20	0	0	0	eine
3	72	10	5	0	0	0	keine
Abkühlen							
1	40	30	20	0	0	0	keine

Sensitivität des HPAC-Nachweises

[0048] Es wurde ein PCR-abgeleitetes Konstrukt verwendet, das die HPAC-Amplikon-Sequenz mit der Pro-

moter-Sequenz für die T7-RNA-Polymerase kombiniert. In einer Verdünnungsreihe wurde eine Nachweisgrenze von 120 HPAC Genom-Äquivalenten pro ml Probe bestimmt, was 10 Genom-Äquivalenten pro 50 µl PCR-Reaktion entspricht (siehe anliegende Figuren).

Kit-Bestandteile

[0049] Alle erforderlichen Materialien, einschließlich Positiv-Kontrollen (in vitro-Transcript von HPAC-RNA) und interne Kontrolle, IC (in vitro-Transcript einer nicht-verwandter Sequenz, beispielsweise ein Segment der Sequenz des Bakteriophagen Lambda).

[0050] Der Master-Mix des Kits enthält alle benötigten Bestandteile, einschließlich Enzymen, jedoch keine Magnesium-Ionen. Magnesium ist im Kit als separate Lösung enthalten. Nach Kombination beider Lösungen des Kits mit der isolierten Nukleinsäure der Probe wird die Mischung direkt im LightCycler-Gerät verwendet, und die Datenanalyse ist ohne weitere Behandlung der Probe möglich.

[0051] Die interne Kontroll-RNA ist im Kit als separate Lösung enthalten. Wahlweise kann diese bereits beim Schritt der Proben-Lyse eingebracht werden (um die Effizienz der Nukleinsäure-Extraktion zu kontrollieren). Sie kann jedoch auch später zum Master-Mix gegeben werden (um ausschließlich die Effizienz der RT-PCR zu kontrollieren).

Beispiel 2

[0052] Nachfolgend wird ein spezifisches Protokoll für die quantitative RT-PCR zum Nachweis des SARS-assoziierten Virus aufgeführt.

[0053] RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR-Reagents zur Verwendung im LightCycler -Gerät (Roche Diagnostics).

1. Inhaltsstoffe

[0054]

	Markierung und Inhaltsstoffe	Art.-Nr. 5601- 01 24 Reaktionen	Art.-Nr. 5601- 02 48 Reaktionen	Art.-Nr. 5601- 03 96 Reaktionen
Blau	HPA-Coronavirus LC Master	2 x 12 Reakt.	4 x 12 Reakt.	8 x 12 Reakt.
Gelb	HPA-Coronavirus LC Mg-Sol	1 x 400 µl	1 x 400 µl	1 x 400 µl
Rot	HPA-Coronavirus LC QS 1° 1 x 10 ⁴ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HPA-Coronavirus LC QS 2° 1 x 10 ³ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HPA-Coronavirus LC QS 3° 1 x 10 ² cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Rot	HPA-Coronavirus LC QS 4° 1 x 10 ¹ cop/µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl	1 x 200 µl
Grün	HPA-Coronavirus LC IC°	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl
Weiß	Wasser (PCR- Qualität)	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl

(QS Quantifizierungsstandard) (IC Interne Kontrolle)

2. Lagerung

[0055] Die Kit-Bestandteile sollten bei -20°C gelagert werden. Sie sind bei dieser Temperatur für 3 Monate stabil. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte verhindert werden, da dies zu einer Verringerung der Sensitivität führen könnte. Sofern das Kit lediglich zeitweise verwendet werden soll, sollten die Reagenzien in Aliquots eingefroren werden. Die Lagerung bei +4°C sollte einen Zeitraum von 5 – 6 Stunden nicht überschreiten.

3. Zusätzlich erforderliche Materialien und Geräte

- Puder-freie Einweghandschuhe
- RNA-Isolierungs-Kit (vgl. 8.1 RNA-Isolierung)
- Physiologische Salzlösung (0.9 % NaCl), enthaltend 1 N-Acetyl-Cystein
- Pipetten (einstellbar auf 1 – 20 µl)
- Sterile Pipettenspitzen mit Aerosol-Barriere
- Vortex-Mischer

- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- LightCycler® -Kapillaren, Roche Diagnostics
- LightCycler® -Kühlblock, Roche Diagnostics
- LightCycler® -Gerät, Roche Diagnostics.

4. Generelle Vorsichtsmaßnahmen für die PCR

[0056] Der Benutzer sollte die nachfolgenden Punkte stets beachten:

- Es sollten Pipettenspitzen mit Filtern verwendet werden.
- Die Lagerung von positivem Material (Proben, Kontrollen und Amplikons) sollte getrennt von allen anderen Reagenzien erfolgen, und die Zugabe derselben zu den Reaktionsgemischen sollte in einer räumlich getrennten Einrichtung erfolgen.
- Alle Bestandteile sollten vor Beginn des Assays sorgfältig bei Raumtemperatur aufgetaut werden.
- Die aufgetauten Bestandteile sollten sorgfältig gemischt und zentrifugiert werden.
- Es sollte zügig auf Eis oder in einem Kühlblock gearbeitet werden.

5. Information bezüglich der Pathogenen

[0057] Bei Coronaviren, einem Genus innerhalb der Familie der Coronaviridae, handelt es sich um große, eingehüllte, RNA-Viren mit Positivstrang, die hochvirulente Erkrankungen in Menschen und Haustieren hervorrufen. Zwei Coronaviren, von denen man weiß, daß sie Menschen infizieren, verursachen ein Drittel aller Erkältungen und sind darüberhinaus eine übliche Ursache für Krankenpflegeassoziierte Infektionen des oberen Respirationstraktes bei Frühgeborenen.

[0058] Es wird angenommen, daß ein Mitglied der Coronavirus-Familie das Schwere Akute Atemwegssyndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) verursacht. Das Virus ist bislang noch nicht klassifiziert worden. In der Literatur wird vorgeschlagen, das Virus Humanes Pneumonie-assoziiertes Coronavirus (Human Pneumonia-Associated Coronavirus, HPAC) zu nennen. Ein Teil eines putativen Coronavirus-Polymerase-Gens wurde mittels PCR vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg sowie kooperierenden Laboratorien in einem SARS-Patienten identifiziert. Dieser Assay wurde verwendet, um ein kommerziell erhältliches Real-Time RT-PCR-System für den direkten Nachweis dieser neuen Coronavirus-Art zu etablieren.

6. Prinzip der Real-Time PCR

[0059] Die Diagnose von Pathogenen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf der Amplifikation von spezifischen Bereichen des Genoms des Pathogenen. Bei der Real-Time PCR wird das amplifizierte Produkt mittels Fluoreszenz-Farbstoffen nachgewiesen. Diese sind üblicherweise an Oligonukleotid-Sonden gebunden, die spezifisch an das amplifizierte Produkt binden. Das Verfolgen der Fluoreszenz-Intensitäten während des PCR-Laufes (d.h. in Real-Time) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von sich anhäufenden Produkten, ohne daß das Reaktionsgefäß nach dem PCR-Lauf wieder geöffnet werden muß.

7. Produktbeschreibung

[0060] Das RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR-Reagents stellt ein gebrauchsfertiges System zum Nachweis von HPA-Coronavirus-RNA unter Verwendung einer PCR im LightCycler -Gerät (Roche Diagnostics) dar. Der HPA-Coronavirus LC Master umfaßt Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation eines 80 bp-Bereichs des HPA-Coronavirus-Genoms sowie für den direkten Nachweis des spezifischen Amplikons im Fluorimeter-Kanal F1 des LightCycler® -Geräts. Zusätzlich enthält das RealArt™ HPA-Coronavirus LC-RT-PCR-Reagents ein zweites heterologes Amplifikationssystem, um eine mögliche PCR-Inhibierung zu identifizieren. Dieses wird als Interne Kontrolle (IC) im Fluorimeter-Kanal F3 nachgewiesen und beeinflusst die analytische HPA-Coronavirus RT-PCR nicht. Externe Positivkontrollen (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) werden ebenfalls bereitgestellt, die die Bestimmung der pathogenen Belastung erlauben. Für weitere Informationen wird auf Abschnitt 8.3 (Quantifizierung) verwiesen.

8. Protokoll

8.1 RNA-Isolierung

[0061] Zahlreiche Hersteller bieten Kits zur RNA-Isolierung an. Die Probenvolumina bei den RNA-Isolierungs-Verfahren sind vom verwendeten Protokoll abhängig. Die RNA-Isolierung wird gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die folgenden Isolierungs-Kits werden empfohlen:

Nukleinsäure-Isolierungs-Kit	Katalognummer	Hersteller
QIAamp UltraSens Virus Test Kit (50)	53 704	QIAGEN
QIAamp Viral RNA Mini Kit	52 904	QIAGEN

[0062] Achtung Es ist wichtig, natives, provoziertes Sputum (wie MTB) zu verwenden. Vermische die Sputum-Probe für 30 Minuten mit physiologischer Salzlösung (0,9 % NaCl), die 1 % N-Acetylcystein enthält. Pelletiere die Zellen (ca. 600 µl) in einer Tischzentrifuge (10.000 g). Entnimm 140 µl des Überstandes und die entsprechenden Zellen parallel (QIAamp viral RNA Mini Kit), füge 560 µl AVL hinzu und fahre mit dem herkömmlichen viralen RNA-Protokoll fort.

– Das RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents sollte nicht in Verbindung mit Isolierungs-Verfahren verwendet werden, die auf Phenol basieren.

– wenn das ausgewählte Isolierungs-Kit keine Träger-DNA/RNA enthält, ist zu beachten, daß die Zugabe von Träger-RNA [RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences] bei einer Konzentration von 10 µg/ml Lyse-Puffer zu der Probe/Lyse-Puffer-Mischung für die Nukleinsäure-Isolierung in hohem Maße empfohlen wird.

– Bei Verwendung von Isolierungs-Protokollen mit Ethanol-haltigen Waschpuffern sollte vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt werden, um verbleibendes Ethanol vollständig zu entfernen. Dies verhindert eine mögliche Inhibierung der PCR.

[0063] Wichtig: Die Interne Kontrolle des RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents kann direkt in dem Isolierungsverfahren verwendet werden (vgl. 8.2 Interne Kontrolle).

8.2 Interne Kontrolle

[0064] Es wird eine Interne Kontrolle (HPA-Coronavirus LC IC) bereitgestellt. Diese erlaubt dem Benutzer sowohl die Kontrolle des Isolierungsverfahrens als auch eine Überprüfung hinsichtlich einer möglichen PCR-Inhibierung. Für diese Anwendung wird die Interne Kontrolle der Isolierung in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zugefügt. Bei Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kits beispielsweise wird die RNA in 50 µl AE-Puffer eluiert. Demgemäß sollten 5 µl der Internen Kontrolle anfänglich zugegeben werden. Wenn die Elution beispielsweise in 100 µl erfolgt, sollte ein entsprechendes Volumen von 10 µl verwendet werden. Die Menge der verwendeten IC hängt lediglich vom Elutionsvolumen ab. Die Interne Kontrolle sollte direkt zu der Probe/Lyse-Puffer-Mischung gegeben werden. Sofern eine RNA-Isolierung aus einer größeren Anzahl von Proben erforderlich ist, kann die Interne Kontrolle direkt zum Lyse-Puffer gegeben werden.

[0065] Die IC kann wahlweise ausschließlich für die Überprüfung hinsichtlich einer möglichen PCR-Inhibierung verwendet werden. Für diese Anwendung werden 0,5 µl der IC und 3 µl HPA-Coronavirus LC Mg-Sol pro Test-Mischung direkt zu 12 µl HPA-Coronavirus LC Master gegeben. Für jede PCR-Reaktion werden 15 µl des Master-Mixes wie oben beschrieben (Die durch die Zugabe der IC verursachte Volumenzunahme wird bei der Herstellung des PCR-Assays vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.) hergestellt, und 5 µl der gereinigten Probe werden anschließend zugegeben. Wenn mehrere Proben für einen PCR-Lauf hergestellt werden, wird das Volumen des HPA-Coronavirus LC Masters, der HPA-Coronavirus LC Mg-Sol und der Internen Kontrolle entsprechend der Anzahl der Proben erhöht (vgl. 8.4 Herstellung der PCR).

8.3 Quantifizierung

[0066] Die beigelegten Quantifizierungs-Standards (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) werden wie die zuvor gereinigten Proben behandelt, und es wird dasselbe Volumen verwendet (5 µl). Um eine Standardkurve im LightCycler®-Gerät zu erzeugen, sollten alle 4 Quantifizierungs-Kontrollen verwendet werden und in dem Sample Loading Screen als Standards mit den spezifizierten Konzentrationen definiert werden (vgl. LightCycler Bedienungshandbuch, Version 3.5, Kapitel B, 2.4. Sample Data Entry). Die wie beschrieben erzeugte Standardkurve kann ferner für nachfolgende Läufe verwendet werden, vorausgesetzt, daß mindestens ein Standard im gegenwärtigen Lauf verwendet wird. Zu diesem Zweck muß die zuvor erzeugte Standardkurve importiert werden (vgl. LightCycler Bedienungshandbuch, Version 3.5, Kapitel B, 4.2.5. Quantifizierung mit einer externen Standardkurve). Dieses Quantifizierungsverfahren kann jedoch aufgrund der Variabilität zwischen verschiedenen PCR-Läufen zu abweichenden Ergebnissen führen:

[0067] Achtung: Die Quantifizierungskontrollen sind als Kopien/µl definiert. Die folgende Formel muß angewendet werden, um die ermittelten Werte unter Verwendung der Standardkurve in Kopien/ml Probenmaterial

umzurechnen:

$\text{Ergebnis (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis (Kopien/}\mu\text{l)} \times \text{Elutionsvolumen (}\mu\text{l)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$
--

8.4 Durchführen der PCR

[0068] Es muß sichergestellt werden, daß der Kühlblock sowie die Kapillar-Adapter (Zubehör des LightCycler-Geräts) auf +4°C vorgekühlt sind. Die erwünschte Anzahl an LightCycler-Kapillaren wird in die Adapter des Kühlblocks eingebracht. Es sollte mindestens ein Quantifizierungsstandard sowie eine Negativkontrolle (Wasser, PCR-Qualität) pro PCR-Lauf verwendet werden. Um eine Standardkurve zu erzeugen, sollten alle bereitgestellten Quantifizierungsstandards (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) für jeden PCR-Lauf verwendet werden. Vor jeder Verwendung müssen alle Reagenzien vollständig aufgetaut und gemischt werden (durch wiederholten Auf- und Abpipettieren oder durch vorsichtiges Vortexen).

[0069] Sofern die Interne Kontrolle verwendet werden soll, um nicht nur eine mögliche PCR-Inhibierung sondern auch das Isolierungsverfahren zu überprüfen, wird die IC bereits der Isolierung (vgl. 8.2 Interne Kontrolle) zugesetzt. In diesem Fall sollte das nachfolgende Pipettierschema verwendet werden (vgl. schematische Übersicht in Fig. 1):

Probenanzahl		1	12
1. Herstellung des Master-Mixes	HPA-Coronavirus LC Master	12 µl	144 µl
	HPA-Coronavirus LC Mg-Sol	3 µl	36 µl
	HPA-Coronavirus LC IC	0 µl	0 µl
	Gesamtvolumen	15 µl	180 µl
2. Herstellung des PCR-Assays	Master-Mix	15 µl	jeweils 15 µl
	Probe	5 µl	jeweils 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	jeweils 20 µl

Sofern die IC ausschließlich verwendet werden soll, um festzustellen, ob eine PCR-Inhibierung vorliegt, muss sie direkt zu dem HPA-Coronavirus LC Master zugegeben werden. In diesem Fall sollte das nachfolgende Pipettierschema verwendet werden (vgl. schematische Übersicht in Fig. 2):

Probenanzahl		1	12
1. Herstellung des Master-Mixes	HPA-Coronavirus LC Master	12 µl	144 µl
	HPA-Coronavirus LC Mg-Sol	3 µl	36 µl
	HPA-Coronavirus LC IC	0.5 µl	6 µl
	Gesamtvolumen	15.5 µl♦	186 µl♦
2. Herstellung des PCR-Assays	Master-Mix	15 µl♦	jeweils 15 µl♦
	Probe	5 µl	jeweils 5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl	jeweils 20 µl

15 µl des Master-Mixes werden in das Plastik-Reservoir jeder Kapillare pipettiert. Anschließend werden 5 µl der eluierten Proben-RNA in jedes Röhrchen gegeben. Dementsprechend müssen 5 µl von mindestens einem der Quantifizierungsstandards (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) als Positivkontrolle und 5 µl Wasser (PCR-Qualität) als Negativkontrolle verwendet werden. Die Kapillaren werden geschlossen. Um die Mischung aus dem Plastik-Reservoir der Kapillare in das Glasröhrchen zu transferieren, werden die Adapter, welche die Kapillaren enthalten, in einer Tischzentrifuge für 10 Sekunden bei maximal 400 x g (2000 rpm) zentrifugiert.

8.5 Programmierung des LightCycler®-Geräts

[0070] Das LightCycler® PCR-Programm zum Nachweis von HPA-Coronavirus RNA kann in vier Schritte unterteilt werden:

- A. Reverse Transkription der RNA **Fig. 3**
- B. Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms **Fig. 4**
- C. Amplifikation der cDNA **Fig. 5**
- D. Abkühlen **Fig. 6**

[0071] Das LightCycler®-Gerät wird für diese vier Schritte gemäß den in den **Fig. 3 – 6** gezeigten Parametern programmiert. Dabei sollte den Einstellungen für Analysis Mode, Cycle Program Data und Temperature Targets besondere Beachtung geschenkt werden. In den Abbildungen sind diese Einstellungen in fettgedruckten Buchstaben hervorgehoben. Weitere Informationen bezüglich der Programmierung des LightCycler®-Geräts können im LightCycler®-Benutzerhandbuch nachgeschlagen werden.

9. Datenanalyse

[0072] Bei der Multi-Farbanalyse treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des LightCycler®-Geräts enthält eine Datei, die Colour Compensation File genannt wird, und diese Interferenzen kompensiert. Diese Datei sollte während oder nach dem PCR-Lauf durch Aktivierung der Choose CCC File-Schaltfläche oder der Choose CC data-Schaltfläche geöffnet werden. Sofern kein Colour Compensation File installiert ist, sollte die Datei gemäß den Anweisungen im LightCycler®-Benutzerhandbuch erzeugt werden. Nachdem der Colour Compensation File aktiviert worden ist, sollten getrennte Signale für die analytische HPA-Coronavirus RT-PCR (F1/F2) und für die Interne Kontrolle (F3/Back-F1) ((Bei Verwendung älterer Software-Versionen (Version 3.3 oder älter) ist die Display-Funktion F3/Back-F1 nicht verfügbar. In diesem Fall sollte F3/F1 gewählt werden, um die Interne Kontrolle zu zeigen.)) in den Fluorimeter-Kanälen F1 und F3 auftreten. Um quantitative Läufe zu analysieren, sollten die Anweisungen in Abschnitt 8.3 (Quantifizierung) befolgt werden.

[0073] Die nachfolgenden Ergebnisse sind möglich:

1. Im Fluorimeter-Kanal F1/F2 wird ein Signal nachgewiesen. Das Ergebnis der Analyse ist positiv: die Probe enthält HPA-Coronavirus-RNA. In diesem Fall kann auf den Nachweis eines Signal in dem F3/Back-F1-Kanal verzichtet werden, da hohe Anfangs-Konzentrationen von HPA-Coronavirus-RNA (positives Signal im F1/F2-Kanal) zu einem verringerten oder fehlenden Fluoreszenz-Signal der Internen Kontrolle im F3/Back-F1-Kanal (Kompetition) führen können.
2. Im Fluorimeter-Kanal F1/F2 wird kein Signal nachgewiesen. Gleichzeitig tritt ein Signal der Internen Kontrolle im F3/Back-F1-Kanal auf. Die Probe enthält keine nachweisbare HPA-Coronavirus-RNA und kann als negativ gewertet werden. Im Falle einer negativen HPA-Coronavirus RT-PCR schließt das nachgewiesene Signal der IC die Möglichkeit einer PCR-Inhibierung aus.
3. Es wird kein Signal im F1/F2- oder F3/Back-F1-Kanal nachgewiesen. Es kann kein Ergebnis festgestellt werden. Informationen hinsichtlich möglicher Fehlerquellen sowie Lösungen können in Abschnitt 10. (Troubleshooting) gefunden werden.

[0074] Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in den **Fig. 7 und 8** dargestellt.

10. Troubleshooting

[0075] Kein Signal mit den Positiv-Kontrollen (HPA-Coronavirus LC QS 1 – 4) im Fluorimeter-Kanal F1/F2:

- Falsche Programmierung des LightCycler®-Geräts.
- Wiederhole die PCR mit korrekten Einstellungen.

[0076] Schwaches oder kein Signal der Internen Kontrolle im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 und gleichzeitiges Fehlen eines Signals im Kanal F1/F2:

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.

- Wiederhole die PCR mit korrekten Einstellungen.
- Der HPA-Coronavirus LC Master wurde zu oft aufgetaut und eingefroren.
- Der HPA-coronavirus LC Master wurde länger als 5-6 Stunden bei +4°C aufbewahrt.
- Beachte die in Punkt 2. (Lagerung) aufgeführten Lagerungsbedingungen. Wiederhole die PCR unter Verwendung eines neuen HPA-Coronavirus LC Master.
- Die PCR wurde inhibiert.
- Stelle sicher, daß ein empfohlenes Isolierungsverfahren (vgl. 8.1 RNA-Isolierung) verwendet wird und halte dich streng an die Anweisungen des Herstellers.

[0077] Obwohl die Erfindung mit Bezug auf die oben aufgeführten Beispiele beschrieben wurde, sollte verstanden werden, dass zahlreiche Modifikationen durchgeführt werden können, ohne vom Kern der Erfindung abzuweichen. Demgemäß ist die Erfindung lediglich durch die Ansprüche beschränkt.

Sequenzprotokoll

<110> Artus GmbH

<120> Verfahren zum Nachweis eines neuen Coronavirus, das mit dem Schweren
Akuten Atemwegssyndrom (SARS) assoziiert ist

<130> G64185

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 300

<212> DNA

<213> SARS-assoziiertes Virus

<400> 1	
taccgtagac tcattctctat gatgggtttc aaaatgaatt accaagtcaa tggttaccct	60
aatatgttta tcaccgcgga agaagctatt cgtcacgttc gtgcgtggat tggctttgat	120
gtagagggt gtcattgcaac tagagatgct gtgggtacta acctacctct ccagctagga	180
ttttctacag gtgtaacct agtagctgta ccgactgggt atgttgacac tgaaaataac	240
acagaattca ccagagttaa tgcaaaacct ccaccaggtg accagtttaa acatcttata	300

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2	
ccgcgaagaa gctattcgtc	20

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3	
gtaggttagt acccacagca tctctagt	28

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> 6-FAM-Modifikation am 5'-Ende
dabcyl-Modifikation am 3'-Ende

<400> 4	
tcgtgcgtgg attggctttg atgt	24

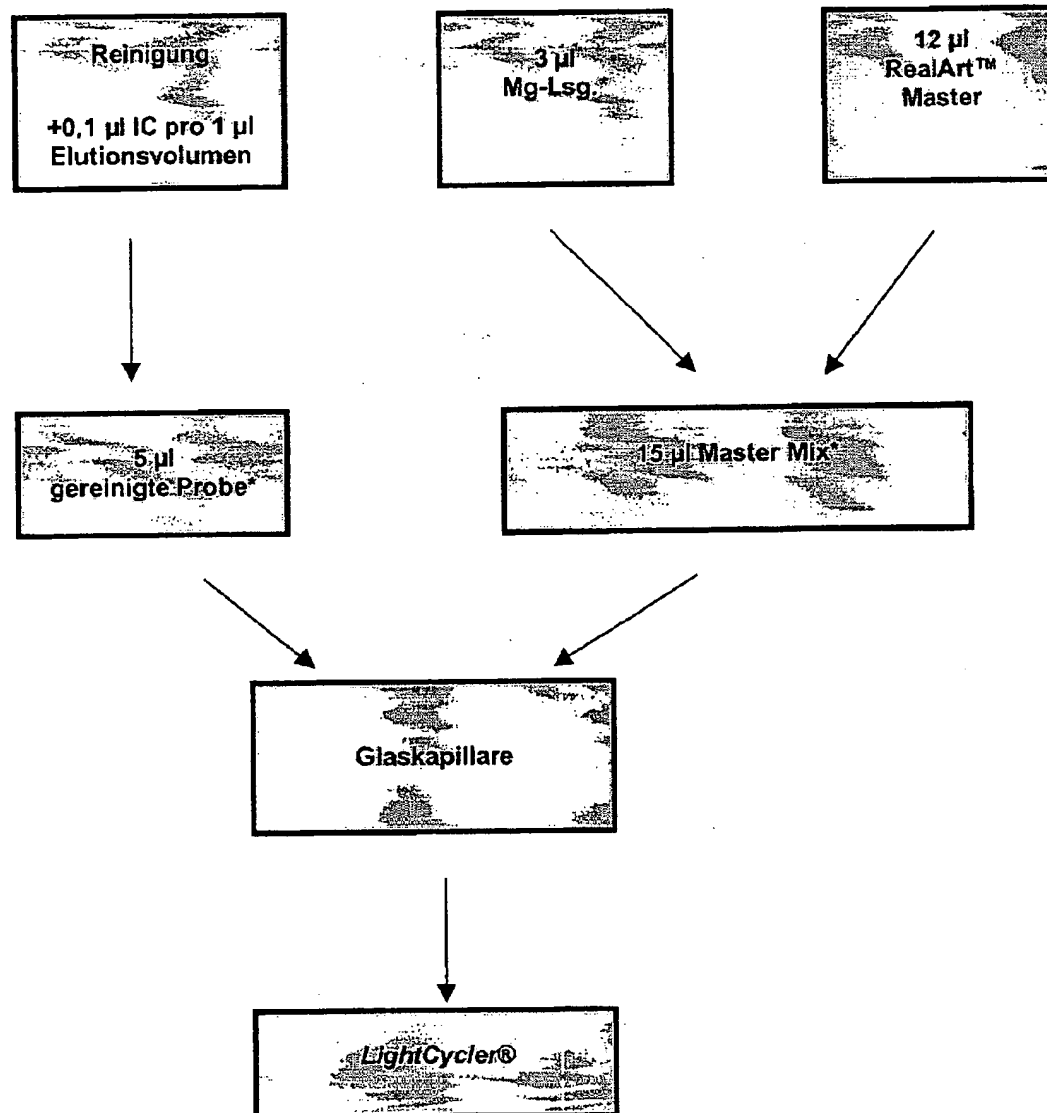
Schutzansprüche

1. Kit zum Nachweis des Schweren Akuten Atemwegssyndromassoziierten Virus (SARS-assoziiertes Virus), genannt HPAC (Humanes Pneumonie-assoziiertes Coronavirus), mittels Real-Time RT-PCR, das einen Forward-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist, einen Reverse-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden umfasst, die an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 89 bis 132 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist.
2. Kit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Forward-Primer die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Sequenz aufweist, der Reverse-Primer die in SEQ ID NO: 3 gezeigte Sequenz aufweist und die Sonde die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Sequenz aufweist.
3. Kit gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Reporter-Farbstoff FAM, 6-FAM, 5-FAM oder ALEXA-288 ist.
4. Kit gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Quencher-Farbstoff TAMRA, DABCYL oder QSY ist.
5. Kit gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, das ferner Enzyme und Reagenzien umfasst, die zur Durchführung einer Real-Time RT-PCR-Reaktion erforderlich sind.
6. Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 69 bis 98 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist.
7. Oligonukleotid gemäß Anspruch 6, das die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Sequenz aufweist.
8. Oligonukleotid mit einer Länge von ungefähr 18 bis 31 Nukleotiden, das an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide 123 bis 168 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist.
9. Oligonukleotid gemäß Anspruch 8, das die in SEQ ID NO: 3 gezeigte Sequenz aufweist.
10. Kit zum Nachweis des Schweren Akuten Atemwegssyndromassoziierten Virus (SARS-assoziiertes Virus), genannt HPAC (Humanes Pneumonie-assoziiertes Coronavirus) mittels Real-Time RT-PCR, das einen Forward-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide von etwa 1 bis etwa 240 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist, einen Reverse-Primer mit einer Länge von ungefähr 18 bis 35 Nukleotiden umfasst, der an einen Bereich bindet, welcher durch die Nukleotide von etwa 60 bis etwa 300 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und eine Sonde mit einer Länge von ungefähr 12 bis 40 Nukleotiden umfasst, die an einen Bereich bindet, der durch die Nukleotide von etwa 21 bis etwa 279 der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz definiert ist; und wobei die Sonde mit zwei Farbstoffen markiert ist, von denen einer ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einer ein Quencher-Farbstoff ist, und wobei mindestens ein Farbstoff ein Fluoreszenz-Farbstoff ist.
11. Kit gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Reporter-Farbstoff FAM, 6-FAM, 5-FAM oder ALEXA-288 ist.
12. Kit gemäß den Ansprüchen 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Quencher-Farbstoff TAMRA, DABCYL oder QSY ist.
13. Kit gemäß den Ansprüchen 10 bis 12, das ferner Enzyme und Reagenzien umfasst, die zur Durchführung einer Real-Time RT-PCR-Reaktion erforderlich sind.

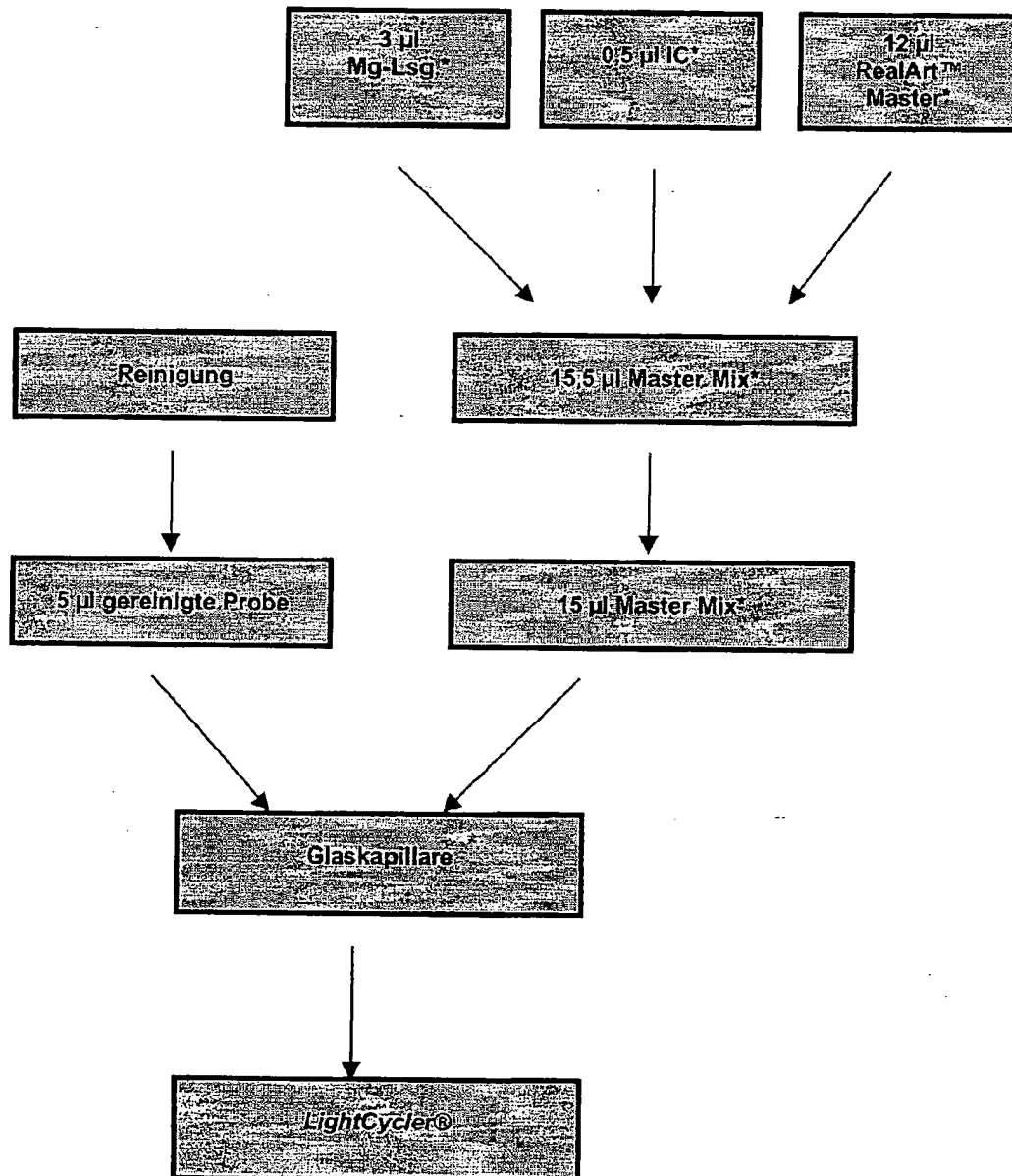
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1:



Figur 2:



Figur 3:

Cycle Program Data		Analysis Mode: None	
Cycles	<input type="text" value="1"/>	<input type="checkbox"/> Quantification <input type="checkbox"/> Melting Curves	
Temperature Targets			
Target Temperature (°C)		Incubation Time (hrs:min:sec)	
<input type="text" value="50"/>		<input type="text" value="10:00"/>	
Temperature Transition Rate (°C/s)		Secondary Target Temperature (°C)	
<input type="text" value="20.00"/>		<input type="text" value="0"/>	
Step Size (°C)		Step Delay (cycles)	
<input type="text" value="0.0"/>		<input type="text" value="0"/>	
Acquisition Mode		<input type="text" value="NONE"/>	
<input type="radio"/> Inc		<input type="radio"/> MS	

Figur 4:

Cycle Program Data		Analysis Mode: None	
Cycles	<input type="text" value="1"/>	<input type="checkbox"/> Quantification <input type="checkbox"/> Melting Curves	
Temperature Targets			
Target Temperature (°C)		Incubation Time (hrs:min:sec)	
<input type="text" value="55"/>		<input type="text" value="10:00"/>	
Temperature Transition Rate (°C/s)		Secondary Target Temperature (°C)	
<input type="text" value="20.00"/>		<input type="text" value="0"/>	
Step Size (°C)		Step Delay (cycles)	
<input type="text" value="0.0"/>		<input type="text" value="0"/>	
Acquisition Mode		<input type="text" value="NONE"/>	
<input type="radio"/> Inc		<input type="radio"/> MS	

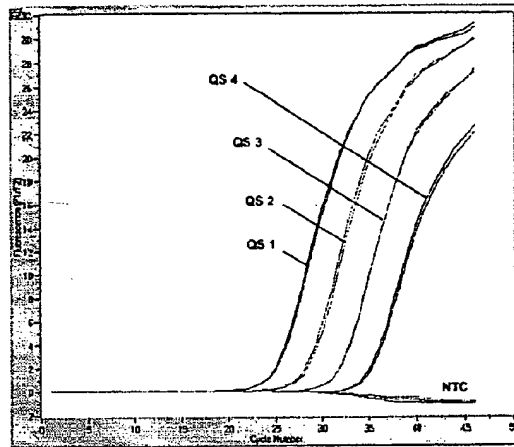
Figur 5:

Cycle Program Data		Analysis Mode	
Cycles	50	<input type="radio"/> None <input checked="" type="radio"/> Quantification <input type="radio"/> Melting Curves	
Temperature Targets			
Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Secondary Target Temperature (°C)
Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
Ins 95	2	20.00	0
Ins 55	12	20.00	0
Ins 72	10	5.00	0
Ins			

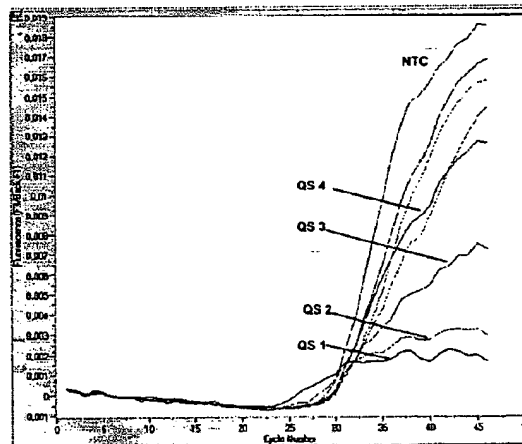
Figur 6:

Cycle Program Data		Analysis Mode	
Cycles	1	<input type="radio"/> None <input checked="" type="radio"/> Quantification <input type="radio"/> Melting Curves	
Temperature Targets			
Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Secondary Target Temperature (°C)
Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode	
Ins 40	30	20.00	0
Ins			

Figur 7:



Figur 8:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.